جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۲ شماره ۱ بهار ۱۳۸۷، صفحات ۵۳-۵۸

اثر غلظت های Sub-MIC دو آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و آمپی سیلین بر روی فعالیت همولیتیکی اشریشیاکلی

سید اصغر هوایی*[۱]، مرتضی ستاری[۲]، مژگان عشاقی[۲]، عبدالرزاق هاشمی شهرکی[۱]

۱) گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
۲) گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تربیت مدرس
نویسنده رابط: سید اصغر هوایی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
همراه: ۰۹۱۳۳۱۳۳۵۳۹ havaei@med.mui.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۲/۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۳/۲۹

چکیده:

زمینه و اهداف: غلظت های کمتر از توقف دهنده رشد (Sub-MIC) به غلظت زیر MIC گفته می شود که می تواند باعث القاء تغییرات مورفولوژیکی، تغییر در میزان بیان فاکتور های ویرولانس و خصوصیات بیوشیمیایی گردد. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر Sub-MIC دو آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و آمپی سیلین بر روی فعالیت همولیتیکی باکتری اشریشیاکلی بود.

روش بررسی: دو ایزوله کلینیکی باکتری اشریشیاکلی که دارای بیشترین فعالیت همولیتیکی در بین ایزوله ها بودند انتخاب شدند، سپس MIC دو آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و آمپی سیلین به روی آنها تعیین شد و سپس غلظت های MIC و Sub-MIC (۱/۸ ، ۱/۴ ، ۱/۲) دو آنتی بیوتیک فوق به روی فعالیت همولیتیکی دو ایزوله بررسی گردید.

یافته ها: در مقایسه با لوله کنترل در مورد آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین، مشخص شد که در غلظت های MIC و Sub-MIC (۱/۸ ، ۱/۴ ، ۱/۲) کاهش معنی داری در میزان فعالیت همولیتیکی مشاهده می شود و هرچه غلظت آنتی بیوتیک کمتر می شد ،میزان فعالیت همولیتیکی بیشتر می گردید . در مقایسه با لوله کنترل در مورد آمپی سیلین ، در غلظت های مختلف آنتی بیوتیک تغییر محسوسی در کاهش میزان فعالیت همولیتیکی مشاهده نشد .

نتیجه گیری: در این مطالعه مشخص گردید که غلظت های Sub-MIC آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین میزان تولید همولیزین را در باکتری اشریشیاکلی کاهش می دهد ولی آمپی سیلین به روی فعالیت همولیتیکی دو ایزوله اشریشیاکلی مورد بررسی تاثیری ندارد.

کلید واژه ها: اشریشیاکلی، فعالیت همولیتیکی، سیپروفلوکساسین، آمپی سیلین، کمترین غلظت ممانعت کننده از رشد(MIC) ، غلظت کمتر از MIC (Sub-MIC)

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه:

اشریشیاکلی یکی از اعضاء خانواده انتروباکتریاسه است که در درون دستگاه گوارش انسان به عنوان فلور نرمال زندگی می کند. تعدادی از سویه های این گونه دارای توانایی ایجاد بیماری های روده ای مانند اسهال، دیسانتری و همچنین بیماری های خارج روده ای مثل عفونت مجرای ادراری می باشد که شایع ترین فرم عفونت های خارج روده ای این باکتری است (۱). سویه های اوروپاتوژنیک اشریشیاکلی باعث تولید عفونت دستگاه ادراری سپتی سمی مننژیت و سپسیس می باشند. اغلب سویه های که ایجاد عفونت می نمایند، انواعی از فاکتورهای ویرولانس را که باعث افزایش پاتوژنیسیتی آنها می شود را تولید می کنند. یکی از این فاکتورهای ویرولانس سم همولیزین است که با تولید سوراخ در غشاء سلول های یوکاریوتی مانند RBC و سلول های اپیتلیالی باعث مرگ این سلول ها می شود (۲). در مدل های حیوانی مختلف ثابت شده است که همولیزین باعث آسیب کلیوی شدید می شود (۳). این توکسین که دارای وزن مولکولی ۱۰۷ کیلو دالتون است در طی فاز رشد لگاریتمی باکتری تولید شده و میزان تولید آن تا اواسط فاز رشد لگاریتمی بالا می رود و در نهایت در طی فاز سکون میزان تولید آن به حداقل می رسد. اثرات درمانی یک آنتی بیوتیک هنگامی که غلظت دارو بیش از غلظت MIC آن در بین دوزهای تجویز شده باشد، بسیار چشمگیر است. منحنی های فارماکوکنتیکی آنتی بیوتیک ها مشخص می کند که غلظت های بیش از غلظت MIC تنها مدت زمان کوتاهی بعد از تجویز دارو بدست می آیند و بعد غلظت دارو شروع به کاهش تدریجی می کند. به غلظت پایین تر از غلظت MIC ، غلظت کمتر از توقف دهنده رشد (**Sub-MIC**) می گویند (۴). این غلظت برای باکتری کشنده نیست، بلکه در مطالعات *in vitro* مشخص شده است که میکروارگانیسم ها را از طرق مختلف مانند محدود کردن رشد، القاء تغییرات مورفولوژیکی، ممانعت و یا کاهش تولید آنزیم ها و توکسین های باکتریایی، محدود کردن اتصال باکتری به سلول های میزبان تحت تاثیر قرار می دهد (۵). سنتز فاکتور های ویرولانس مثل پروتئاز ها و اگزوتوکسین A در *سودوموناس آئروژینوزا* به شدت توسط سیپروفلوکساسین هم در شرایط *in vitro* و هم در شرایط *in vivo* کاهش پیدا می کند. اثرات مشابه توسط کوئینولون ها در غلظت Sub-MIC به روی فاکتور های ویرولانس اشریشیاکلی گزارش شده است (۶). در یک مطالعه مشخص شد که سیپروفلوکساسین اختصاصا باعث تغییر مورفولوژی و خصوصیات بیوشیمیایی باکتری اشریشیاکلی می شود (۷). هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر Sub-MIC دو آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و آمپی سیلین به روی میزان فعالیت همولیتیکی اشریشیاکلی بود.

مواد و روش ها :

تهیه سویه ها:

در این مطالعه از بین سویه های کلینیکی دو سویه اشریشیاکلی که از عفونت های ادراری جدا شده بودند و دارای همولیز قوی بودند انتخاب شدند .

تعیین MIC به روش رقیق سازی آگار (Agar dilution susceptibility test):

به منظور بررسی MIC دو سویه فوق نسبت به داروی سیپروفلوکساسین (شرکت آریا) و آمپی سیلین (شرکت جابرابن حیان)، از روش رقیق سازی آگار (Agar dilution susceptibility test) بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده گردید (۸).

بررسی فعالیت همولیتیکی سویه ها به روش کمی:

ابتدا دو کلنی مجزا از هر سویه مورد نظر را از محیط جامد وارد ۱۰ ml از محیط TSB نموده و ۱ شبانه روز در دمای ۳۷ $^{\circ}C$ ، انکوبه گردیدند. سپس ۱ ml از سوسپانسیون هر ایزوله را در ۹ ml محیط TSB جدید که حاوی کلرید سدیم ۱۰ میلی مولار و کمی گرم شده بود، وارد گردیده و به مدت ۲/۵ ساعت در دمای ۳۷ $^{\circ}C$ ، انکوبه گردیدند تا سلول های باکتری وارد فاز انتهایی رشد لگاریتمی شوند و همولیزین را در بالاترین حد تولید نمایند (۹). به دلیل اینکه توکسین به دمای بالا حساس است بقیه مراحل در دمای ۴ $^{\circ}C$ انجام شد. محیط کشت های حاوی توکسین را در سانتریفیوژ یخچال دار با دور ۱۵۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ $^{\circ}C$ سانتریفیوژ گردیدند. سپس مایع رویی هر محیط کشت در یک لوله مجزای استریل جمع آوری و نگهداری شدند. برای تعیین فعالیت همولیتیکی آلفا همولیزین اشریشیاکلی ار خون ۱ ٪ یا ۲٪ گوسفند استفاده شد، به این ترتیب که در یک لوله استریل ۱ ml از مایع رویی حاوی توکسین هر ایزوله و ۱ ml سوسپانسیون خون گوسفند (۲٪) وارد شد و در بن ماری ۳۷ $^{\circ}C$ به مدت یک ساعت انکوبه گردید. بعد از این زمان لوله ها از بن ماری خارج شدند و ۲ ml محلول PBS سرد به هر لوله افزوده گردید تا واکنش بین توکسین و RBC لیز نشده متوقف گردد و RBC های لیز نشده رسوب نمایند . مایع رویی هر لوله جدا شد و میزان جذب آن در طول موج ۵۴۵ نانومتر آنالیز گردید. در این مطالعه لوله کنترل

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

حاوی ml ۱ سوسپانسیون ۲٪ از RBC گوسفند و ml ۳ محلول PBS بود (۱۰).

بررسی اثر MIC و Sub-MIC (۱/۸ ، ۱/۴ ،۱/۲) آنتی بیوتیک ها به روی فعالیت همولیتیکی دو ایزوله:

برای هر آنتی بیوتیک ابتدا ۵ ارلن کوچک انتخاب شد که در ۴ عدد از آنها ml ۸ از محیطTSB حاوی کلرید کلسیم ۱۰ میلی مولار وارد شد. بعد از استریل کردن محیط های کشت، به هر کدام از ارلن ها به ترتیب ml ۱ از غلظت های MIC وSub-MIC (۱/۸ ، ۱/۴ ،۱/۲) که قبلاً به دست آمده بود افزوده شد. ارلن پنجم تنها حاوی ml ۹ از محیط TSB ، کلرید کلسیم ولی فاقد آنتی بیوتیک بود. در مرحله بعد ، از کشت ۲۴ ساعته باکتری ها در محیط TSB بـه میـزان ml ۱ بـه هـر کدام از ۵ ارلن اضافه شد (حجم نهایی ml ۱۰ بود). این محیط ها به مدت ۲/۵ ساعت در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ ، انکوبه گردیدند و بقیه مراحل کار یعنی تعیین فعالیت همولیتیکی طبق قسمت اول انجام شد.

یافته ها:

در این مطالعه سویه های مورد نظر را از بین ایزوله های بالینی انتخاب کرده و اثر Sub-MIC دو آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و آمپی سیلین به روی فعالیت همولیتیکی باکتری اشریشیاکلی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله نشان می دهد که آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین در غلظت های ۱/۲MIC، ۱/۴ MIC و MIC ۱/۸ نسبت به گروه کنترل (جدول شماره ۱) از فعالیت همولیتیک سویه های مورد آزمایش جلوگیری نمود ($P<۰/۰۵$). فعالیت همولیتیکی سویه های مورد آزمایش در مجاورت غلظت های Sub-MIC آمپی سیلین (جدول شماره ۲)، نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی داری را نشان نداد ($P<۰/۰۵$).

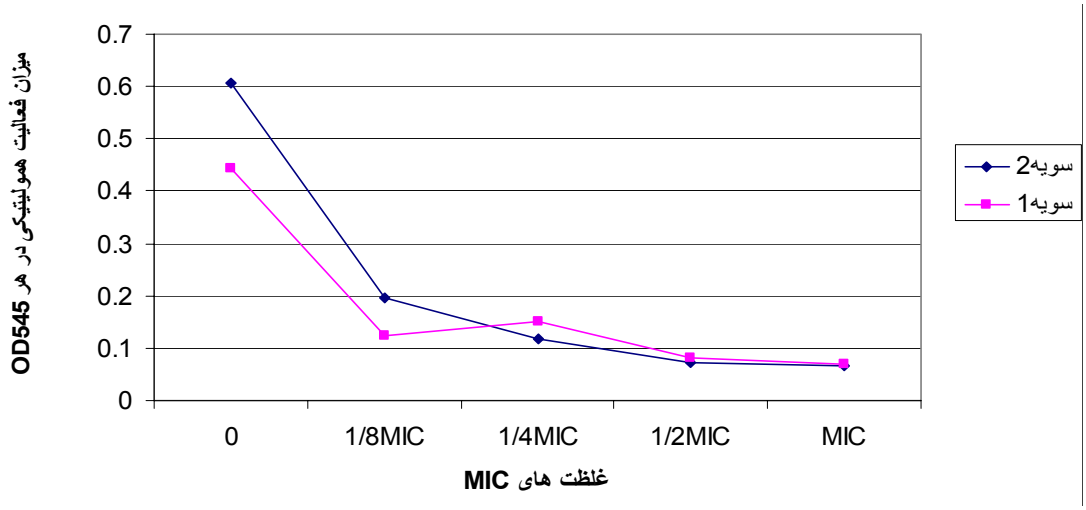
جدول ۱: اثر غلظت های مختلف سیپروفلوکساسین بر فعالیت همولیتیکی سویه های مورد بررسی در OD545

غلظت های مختلف سیپروفلوکساسین / سویه های باکتری	صفر (کنترل)	۱/۸ MIC	۱/۴ MIC	۱/۲ MIC	MIC
سویه ۱	۰/۶۰۶	۰/۱۹۵	۰/۱۱۷	۰/۰ ۷۱	۰/۰ ۶۶
سویه ۲	۰/۴۴۵	۰/۱۲۳	۰/۱۵۲	۰/۰۸۲	۰/۰۷۰

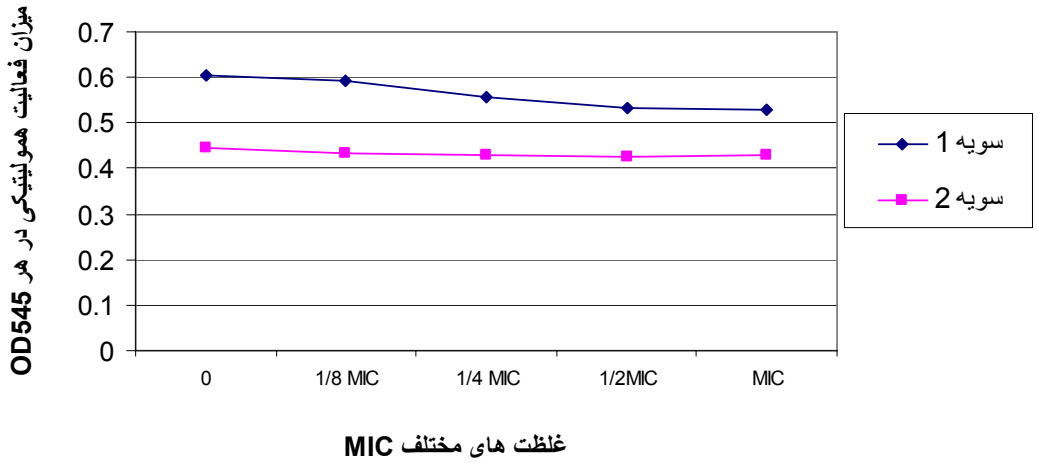
جدول ۲: اثر غلظت های مختلف آمپی سیلین بر فعالیت همولیتیکی سویه های مورد بررسی در OD545

غلظت های مختلف آمپی سیلین / سویه های باکتری	صفر (کنترل)	۱/۸ MIC	۱/۴ MIC	۱/۲ MIC	MIC
سویه ۱	۰/۶۰۶	۰/۵۹۳	۰/۵۵۸	۰/۵۳۱	۰/۵۲۹
سویه ۲	۰/۴۴۵	۰/۴۳۵	۰/۴۳۱	۰/۴۲۵	۰/۴۲۸

نمودار ۱: اثر غلظت های مختلف سیپروفلوکساسین بر روی فعالیت همولیتیکی سویه ها



نمودار۲: اثر غلظت های مختلف آمپی سیلین بر روی فعالیت همولیتیکی سویه ها



بحث:

آلفا همولیزین یک توکسین پروتئینی خارج سلولی با وزن مولکولی ۱۰۷ کیلو دالتون است که توسط سویه های پاتوژن اشریشیاکلی که عفونت خارج روده ای مانند عفونت مجاری ادراری، پریتونیت، مننژیت و سپتی سمی ایجاد می کنند، تولید می شوند. به نظر می رسد که آلفا همولیزین، یک فاکتور ویرولانس مهم برای باکتری است (۱). مطالعات نشان داده است که فعالیت همولیتیکی باکتری اشریشیاکلی تحت تاثیر عوامل محیطی مانند ترکیب محیط کشت، pH ، دما، میزان اکسیژن، غلظت کلسیم و آهن می باشد. در سال ۱۹۸۳ اثر Sub-MIC کلرامفنیکل، جنتامایسین و استرپتومایسین بر تولید همولیزین باکتری اشریشیاکلی اوروپاتوژن بررسی شد که استرپتومایسین بدون ممانعت از رشد باکتری تولید همولیزین را ممانعت نمود (۱۱). همچنین در تحقیقی دیگر اثر غلظت های MIC ۱/۲ کوئینولون ها به روی باکتری اشریشیاکلی باعث طویل شدن شکل باکتری و همچنین کاهش تولید میزان همولیزین توسط باکتری گردید (۱۲). نتایج تحقیق فوق با نتایج به دست آمده در این مطالعه مطابقت دارد ، به این ترتیب که سیپروفلوکساسین در غلظت Sub-MIC باعث کاهش میزان تولید همولیزین گردید. در این مطالعه نیز مشخص شد که غلظت Sub-MIC آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین میزان تولید همولیزین را کاهش می دهد ولی آمپی سیلین به روی فعالیت همولیتیکی دو ایزوله اشریشیاکلی مورد بررسی تاثیری نداشت. اخیراً نیز مشخص شده است که غلظت Sub-MIC الزاماً باعث کاهش بیان توکسین های باکتریایی نمی شود، چرا که در تحقیقی مشخص شد که غلظت Sub-MIC آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین باعث القاء تولید توکسین Cytolethal Distending Toxin در کمپیلو باکتر

ژوژنی می گردد (۱۳). در مطالعات مشابه به روی باکتری اشریشیاکلی، اثرات Sub-MIC تعدادی از آنتی بیوتیک ها منجمله سیپروفلوکساسین روی فاکتور های ویرولانس بررسی شده است. در یک مطالعه ثابت گردید کـه سیپروفلـوکسـاسیـن در غلظت Sub-MIC باعث ممانعت از بیان فیمبریه نوع P می گردد که این غلظت می تواند از کولونیزه شدن باکتری در دستگاه ادراری ممانعت کند (۱۴). در عین حال در مطالعه ای مشخص گردید که سیپروفلوکساسین در غلظتSub-MIC در بعضی از سویه های اوروپاتوژن باکتری اشریشیاکلی، باعث افزایش بیان شدن تعدادی از فاکتورهای اتصالی مانند ادهیزین های مقاوم به مانوز غیر از فیمبریه نوع P می شود کـه در نهـایت منتهی به اتصال این سویه ها به کاتتر های موجود در مجرای ادراری می گردد (۱۵). در مطالعه ای دیگر در مـورد آنتـی بیـوتیـک سیپـروفلـوکساسین در قیاس با دیگر کوئینولون ها نیز مشخص گردید که غلظت Sub-MIC این آنتی بیوتیک دارای اثرات ضعیف تری برای کاهش بیان فاکتور های ویرولانس سطحی است (۱۶).

نتیجه گیری :

همولیزین از فاکتور های مهم ویرولانس می باشد که غلظت های مختلف Sub-MIC آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین میزان تولید آنرا در باکتری اشریشیاکلی کاهش می دهد لذا می تواند ویرولانس سویه های کولونیزه شده را کاهش دهد و از قدرت تهاجم آنها بکاهد. این در حالی است که آمپی سیلین روی فعالیت همولیتیکی دو سویه تاثیری نداشت . با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و نتایج تحقیقات دیگران توصیه می گردد که اثر غلظت های مختلف Sub-MIC در مورد آنتی بیوتیک های دیگر بر روی فاکتورهای ویرولانس اشریشیاکلی مورد بررسی قرار گیرد.

فهرست مراجع:

1. Johnson J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4, 80-128.
2. Cavalieri S.J, Bohach G.A, Synder IS. *Escherichia coli* α-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenesis. *Microbiol Rev* 1984; 48(4):326-43.
3. Salyers A.A and Whitt D.D. Bacterial pathogenesis, A molecular approach.2nd ed. ASM Press, Washington DC. 2001; pp; 137-9.
4. Wojnicz D. and Jankowski S. Effects of sub inhibitory concentrations of amikacin and ciprofloxacin on the hydrophobicity and adherence to epithelial cells of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 700-4.
5. Dal Sasso M., Culici M., Bovio C. and Braga PC . Gemifloxacin: effects of Sub-inhibitory concentrations on various factors affecting bacterial virulence. *Int J Antimicrob Agents* 2003 ;21: 325–33.
6. Burnham J.C and Senstein S.A. Anti virulence effects of lomefloxacin and other quinolones .In program and abstracts of the thirtieth interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy , Atlanta, GA ,1990, Abstract 110, p:245.American Society for Microbiology, Washington DC.
7. Diver J.M and Wise R. Morphological and biochemical changes in *Escherichia coli* after exposure to ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother* 1986; 18(Suppl. D):31-41.
8. Villanova P.A. National committee for clinical laboratory standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Second information supplement M 100-S2 1987; .National Committee. for Clinical Laboratory Standards ,USA.
9. Short E.C and Kurtz H.J. Properties of the hemolytic activities of *Escherichia coli*. *Infec Immun* 1971; 3 (5):678-89.
10. Bohach G.A, Cavalieri S.J, and Snyder I.S. Purification of Escherichia coli α hemolysin .*Methods Enzymol* 1988; 165:137-47.
11. Shible A.M and Gemmerll C.G. Effect of four antibiotics on hemolysis production and adherence to human uroepithelial cells by *Escherchia coli*. Med Microbiol 1983; 16:341-349.
12. Guan L. and Burnham J. C. Post antibiotic effect of CI-960, ciprofloxacin and enoxacin on *Escherichia coli*: effect on morphology and haemolysin activity. *J Antimicrob Chemother* 1992; 29:529-38.
13. Ismaeel A , Senok A C , Bindayna K M , Bakhiet M, Al Mahmeed A, Yousif AQ, et al.

Effect of antibiotic sub inhibitory concentration on cytolethal distending toxin production by *Campylobacter jejuni*. *J Infect* 2005; 51(2): 144-9

14. Vranes, J., Zagar, Z. & Kurbel, S. Influence of subinhibitory concentrations of ceftazidime, ciprofloxacin and azithromycin on the morphology and adherence of P fimbriated *Escherichia coli*. J Chemother 1996; 8(4): 254–60.

15. Balague C, Fernández L, Pérez J, Grau R. Effect of ciprofloxacin on adhesive properties of non-P mannose-resistant uropathogenic *Escherichia coli* isolates. J Antimicrob Chemother 2003; 51(2): 401–4.

16. Baskin H, Dogan Y, Bahar IH, Yuluğ N. Effect of subminimal inhibitory concentrations of three fluoroquinolones on adherence of uropathogenic strains of *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19(1): 79–82.